

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 47/48, 47/36, 9/00, 31/47, C07D 491/22</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/61061</p> <p>(43) 国際公開日 1999年12月2日(02.12.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02681</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月21日(21.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/140915 1998年5月22日(22.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 洲崎 浩(SUSAKI, Hiroshi)(JP/JP) 井上和弘(INOUE, Kazuhiro)(JP/JP) 久我 洋(KUGA, Hiroshi)(JP/JP) 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: DRUG COMPOSITES</p> <p>(54)発明の名称 薬物複合体</p> <p>(57) Abstract Drug composites useful as DDS compounds, which are represented by the general formula: A-R-NH-Y-CH<sub>2</sub>-O-CO-Q (wherein A is a polymer serving as a carrier for a drug; R is a spacer comprising one amino acid molecule or one comprising 2 to 8 amino acid molecules bound to each other through peptide linkage; Y is optionally substituted phenylene; and Q is a residue of a drug compound such as an antitumor agent). The composites permit the speedy and regioselective release of drug compounds such as antitumor or anti-inflammatory agents, thus exhibiting expected drug effects without fail.</p>		

(57)要約

下記の式： $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-Q$ （式中、Aは薬物担体である高分子を示し；Rは1個のアミノ酸を含むスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーを示し；Yは置換基を有していてもよいフェニレン基を示し；Qは抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基を示す）で表されるDDS化合物として有用な薬物複合体。抗腫瘍剤や抗炎症剤などの医薬化合物を部位選択的に速やかに遊離することができ、期待される薬効を確実に発揮できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FR	フランス	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LT	リトアニア	SL	シネラ・レオネ
BE	ベルギー	GE	グルジア	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	CH	スイス	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	CM	ガンビア	MA	モロッコ	TD	チャド
BJ	ベナン	GN	ギニア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	CR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	クロアチア	MK	マケドニア共和国	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CF	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KO	韓国	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KR	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

## 明 細 書

## 薬 物 複 合 体

## 技術分野

本発明は、多糖誘導体などの薬物担体と抗腫瘍剤などの医薬化合物とをスペーサーを介して結合させた薬物複合体に関するものである。

## 背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が制限される場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、カルボキシル基を有する多糖誘導体を薬物担体として用い、該多糖誘導体に対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、国際公開 W094/19376 号には、カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数 1~8）が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシン C、又はブレオマイシンなどを結合した薬物複合体が開示されている。また、特公平 7-84481 号公

報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介して上記の抗腫瘍剤を導入した薬物複合体が開示されている。これらの薬物複合体は、薬物担体に結合された抗腫瘍剤自体に比べてより優れた抗腫瘍効果を有するとともに、毒性・副作用が軽減されていることを特徴としている。

その他、ポリアルコール化多糖誘導体を薬物担体として用いた薬物複合体に関する技術については、「多糖-ペプチド-ドキシソルビシン複合体に関する研究・多糖誘導体の血中安定性と抗腫瘍効果の関係」(第10回日本DDS学会講演要旨集, 279, 1994); 「多糖-ペプチド-ドキシソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」(第9回日本薬物動態学会年会講演要旨集, 292, 1994); 第19回研究開発動向セミナー(医薬品機構主催)要旨集, D-9, 1995; 及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」(第12回コロイド・界面技術シンポジウム, 日本化学会, 講演要旨集, 51, 1995)などの報告がある。一方、抗腫瘍剤を抗体などに結合させるための技術として、パラアミノベンジルオキシカルボニル基とペプチド基とを組み合わせた試薬が開発されているが(Dubowchik, G.M., Tetrahedron Lett., 38, 5257, 5261, 1997)、上記のような薬物担体を備えた薬物複合体への応用は知られていない。

#### 発明の開示

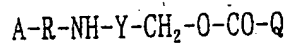
本発明者らは、多糖誘導体などの薬物担体と抗腫瘍剤などの医薬化合物とを1から8個のアミノ酸を含むスペーサーを介して結合させた薬物複合体について鋭意研究を進め、抗腫瘍剤などの医薬化合物を目的組織に対して部位選択的に移行させることができる薬物複合体を提供することに成功した(WO97/46260)。しかしながら、1から8個のアミノ酸を含むスペーサーを含む薬物複合体では、医薬化合物の遊離速度が必ずしもスペーサー部分の酵素的分解(ペプチダーゼによる加水分解)速度に依存せず、遊離速度が医薬化合物の立体構造に影響される場合があることが判明した。特に、医薬化合物の反応性官能基(例えばアミノ基)とスペーサーとの結合部分に立体障害がある場合には、この傾向が特に顕著である

ことが見出された。また、このような薬物複合体では、スパーサーの酵素的分解により遊離された医薬化合物にスパーサー由来のアミノ酸が1個ないし数個残存する場合があります、その結果、医薬化合物の放出にばらつきが生じることがあった。

従って、本発明の課題は、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの医薬化合物と薬物担体とを1から8個のアミノ酸を含むスパーサーを介して結合させた薬物複合体であって、有効成分を腫瘍部位などに対して部位選択的に移行させることができ、かつ医薬化合物の遊離速度が実質的にスパーサー部分の酵素的な分解速度に依存する薬物複合体を提供することにある。また、本発明の別の課題は、医薬化合物の遊離速度が医薬化合物の立体構造によって実質的に影響を受けず、スパーサー部分の酵素的な分解速度から期待される医薬化合物の遊離速度を達成できる薬物複合体を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの医薬化合物と薬物担体とを1から8個のアミノ酸を含むスパーサーを介して結合させた薬物複合体において、該スパーサーと医薬化合物との間にさらにアミノベンジルオキシカルボニル基などを挿入すると、スパーサー部分の酵素的分解が生じると直ちにアミノベンジルオキシカルボニル基が非酵素的に加水分解されて医薬化合物が遊離されること、並びにこの薬物複合体では医薬化合物の遊離速度が医薬化合物の立体構造には影響されず、実質的にスパーサー部分の酵素的な分解速度に依存していることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。本発明の薬物複合体では、医薬化合物の立体構造を考慮することなく、スパーサー部分の酵素的分解速度を基にして医薬化合物の遊離速度を制御することができるという特徴がある。

すなわち、本発明によれば、下記の式(I)：



(式中、Aは薬物担体である高分子を示し；Rは1個のアミノ酸を含むスパーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスパーサーを示し；Yは置換基を有していてもよいフェニレン基を示し；Qは医薬化合物の残基を示す)で

表される薬物複合体が提供される。この薬物複合体は、例えば、DDS（ドラッグ・デリバリー・システム）機能を備えたDDS化合物として有用である。

別の観点からは、 $R'-NH-Y-CH_2-O-CO-Q$ （式中、 $R'$ は1個のアミノ酸又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含み、N末端が保護されている又は保護されていない基を示し； $Y$ は置換基を有していてもよいフェニレン基を示し； $Q$ は医薬化合物の残基を示す）で表される化合物；及び、下記の式： $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-X$ （式中、 $A$ は薬物担体である高分子を示し； $R$ は1個のアミノ酸を含むスパーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスパーサーを示し； $Y$ は置換基を有していてもよいフェニレン基を示し； $X$ は水酸基、 $-O-M$ （ $M$ はカルボキシル基の保護基を示す）、又は脱離基を示す）で表される化合物が提供される。これらの化合物は、上記の薬物複合体の製造用中間体として有用である。

本発明の好ましい態様によれば、薬物担体がカルボキシル基を有する多糖誘導体である上記薬物複合体； $R$ がペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスパーサーである上記薬物複合体； $Y$ が置換基を有していてもよい  $p$ -フェニレン基である上記薬物複合体； $Y$ が無置換  $p$ -フェニレン基である上記薬物複合体；カルボキシル基を有する多糖誘導体がカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールである上記薬物複合体；カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである上記薬物複合体；カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記薬物複合体；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記薬物複合体； $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-$ と医薬化合物のアミノ基とが結合した上記薬物複合体；並びに、医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記薬物複合体が提供される。

## 図面の簡単な説明

図1は、本発明の薬物複合体(例1)の GPC (gel permeation chromatography) チャートを示す。

図2は、本発明の薬物複合体(例1)の紫外線吸収スペクトルを示す。

図3は、本発明の薬物複合体(例5)の GPC チャートを示す。

図4は、本発明の薬物複合体(例5)の紫外線吸収スペクトルを示す。

図5は、本発明の薬物複合体(例7)の GPC チャートを示す。

図6は、本発明の薬物複合体(例7)の紫外線吸収スペクトルを示す。

## 発明を実施するための最良の形態

本発明により提供される薬物複合体は、式(I)： $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-Q$  で表される。式中、Qは医薬化合物の残基を示すが、本発明の薬物複合体に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物の主要な部分構造であり、少なくともその医薬作用の発現に不可欠な部分を含むものを意味している。もっとも、該医薬化合物の用途は上記のものに限定されることはなく、医薬化合物としては、 $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-$ で表される基のカルボニル基との結合に関与できる1又は2以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

本明細書において医薬化合物の残基とは、 $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-$ で表される基のカルボニル基と医薬化合物残基との結合が、医薬化合物中の反応性官能基と  $A-R-NH-Y-CH_2-O-COOH$  で表されるカルボキシル基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の薬物複合体中に存在する医薬化合物に由来する部分構造のことである。例えば、医薬化合物が  $D-NH_2$ 、 $D-$



NH-D', D-OH, 及び D-SH で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ D-NH-, D-N(D')-, D-O-, 及び D-S- で表すことができ、これらの医薬化合物を用いた薬物複合体は、それぞれ A-R-NH-Y-CH<sub>2</sub>-O-CO-NH-D, A-R-NH-Y-CH<sub>2</sub>-O-CO-N(D')-D, A-R-NH-Y-CH<sub>2</sub>-O-CO-O-D 及び A-R-NH-Y-CH<sub>2</sub>-O-CO-S-D で表すことができる。もっとも、A-R-NH-Y-CH<sub>2</sub>-O-CO-で表される基と医薬化合物残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。

医薬化合物としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン等）などの抗腫瘍剤を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

Yで表されるフェニレン基としては、o-フェニレン基又はp-フェニレン基のいずれを用いてもよい。フェニレン基が置換基を有する場合、置換基の種類、並びに置換基の個数及び置換位置は特に限定されない。フェニレン基の環上に存在可能な置換基の例としては、例えば、低級アルキル基（直鎖若しくは分枝鎖のC<sub>1-6</sub>アルキル基、又は環状のC<sub>3-6</sub>アルキル基など。以下、低級アルキル部分を含む置換基についても同様である）、ハロ低級アルキル基（クロロメチル基、トリフルオロメチル基など）、ヒドロキシ低級アルキル基（ヒドロキシメチル基など）、低級アルコキシ基（メトキシ基、エトキシ基など）、低級アルケニル基（ビニル基、アリル基など）、低級アルキニル基（プロパルギル基など）、水酸基、ハロゲン原子（フッ素原子、塩素原子、臭素原子、又はヨウ素原子のいずれでもよい）、カ

ルボキシシル基、アルコキシカルボニル基（メトキシカルボニル基など）、アルカノイル基（アセチル基など）、ハロアルカノイル基（トリフルオロアセチル基など）、アリール基（フェニル基、ナフチル基など）、アラルキル基（ベンジル基など）、アリールオキシ基（フェノキシ基など）、アラルキルオキシ基（ベンジルオキシ基など）、アロイル基（ベンゾイル基など）、ヘテロアリール基（ビリジル基、キノリル基など）、アミノ基、モノ若しくはジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、ニトロ基、シアノ基、低級アルキルスルフィニル基、低級アルキルスルホニル基、チオール基、又は低級アルキルチオ基などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

フェニレン基の環上に2以上の置換基が存在する場合には、それらは同一でも異なってもよい。また、これらの置換基がさらに別の1又は2以上の官能基を有していてもよい。このような置換基の例として、具体的には、クロロフェニル基、メチルカルバモイル基、クロロベンジル基、アルコキシベンジル基などを挙げることができる。Yが示すフェニレン基としては、置換又は無置換のp-フェニレン基が好ましく、無置換のp-フェニレン基が特に好ましい。

Rはスペーサーを示す。本明細書において用いられるスペーサーという用語は、本発明の薬物複合体の部分構造であって、薬物担体である高分子と医薬化合物残基との間に存在し、1個のアミノ酸又は2ないし8個のアミノ酸からなる部分を意味しており、医薬化合物を遊離すべきではない組織や血中などにおいては医薬化合物残基を薬物担体に保持し、医薬化合物を遊離すべき組織（例えば腫瘍組織など）においては酵素的に分解されて医薬化合物を遊離する役割を有する。スペーサーとしては、1個のアミノ酸を含むスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーを用いることができる。該スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシ基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸を含むオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシ基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基

を意味する)の形態を有しており、C末端(1個のアミノ酸を含むスパーサーの場合にはカルボキシル基)で  $\text{NH-Y-CH}_2\text{-O-CO-Q}$  にペプチド結合するように配置される。

一般的には、Aで表される薬物担体とスパーサーとの結合は、薬物担体のカルボキシル基とオリゴペプチドスパーサーのN末端(1個のアミノ酸を含むスパーサーの場合にはアミノ基)とのペプチド結合により形成される。もっとも、スパーサーと薬物担体との結合は上記のペプチド結合に限定されることはなく、他の化学結合や1又は2以上のスパーサーを利用した結合であってもよい。例えば、スパーサー中に1個又は2個以上のジカルボン酸化合物の残基(例えばコハク酸などのジカルボン酸の残基など)を構成単位として含めて両末端がカルボキシル基となるようなスパーサーとした場合には、薬物担体中の反応性アミノ基などを結合に利用できる。

好ましいスパーサーは2から6個のアミノ酸を含むオリゴペプチドの残基である。スパーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 $\alpha$ -アミノ酸のほか、 $\beta$ -アラニン、 $\epsilon$ -アミノカプロン酸、 $\gamma$ -アミノ酪酸などを用いてもよい。このような $\alpha$ -アミノ酸以外のアミノ酸は、スパーサー中で薬物担体に近接した位置に配置されることが好ましい。

オリゴペプチドを含むスパーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スパーサーが  $\text{-X-Z-}$  で表されるジペプチドの残基(Xは疎水性アミノ酸の残基を示し、Zは親水性アミノ酸の残基を示し、 $\text{-X-Z-}$  は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z)とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する)であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスパーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、

アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-, -X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離するので、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明の薬物複合体の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、濃度に依存した抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤（より高い濃度でより強い抗腫瘍作用を発現する抗腫瘍剤：濃度依存型の抗腫瘍剤、例えば、ドキソルビシンなど）の残基を用いる場合には、-X-Z-で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが好ましい。

一方、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする抗腫瘍剤（例えば、メトトレキサートなど）を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合があるが、一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の体内動態の特徴や毒性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。特に、本発明の薬物複合体における医薬化合物の遊離速度は、スペーサー部分の酵素的分解が実質的な律速段階になっているので、適宜のスペーサーを酵素的分解速度の見地から選択することによって医薬化合物の所望の遊離速度を容易に達成できる。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチドの具体例は特開平 11-92405 号公報の表 1 に記載されており、これらのオリゴペプチドは本発明のスペーサーとして好適に使用できる。

Aで表される薬物担体としては、多糖誘導体のほか、合成高分子などを用いることができる。多糖誘導体及び合成高分子としては、生体に対して実質的に毒性を示さず、薬物担体として作用できるものであればいかなるものを用いてもよい。

例えば、薬物複合体の製造に従来より用いられている多糖誘導体及び合成高分子は本発明の薬物複合体にいずれも利用可能である。例えば、カルボキシル基を有する多糖誘導体は本発明の薬物複合体に好適に使用でき、ポリアルコール化多糖誘導体は特に好適である。また、合成高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール類；ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、若しくはポリリジンなどのポリアミノ酸類；又は N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド誘導体などのポリビニル化合物の誘導体を挙げることができる。

より具体的には、カルボキシル基を有する多糖誘導体としては、例えば、多糖類又はそれらを化学的若しくは生物学的に修飾した誘導体であって分子中にカルボキシル基を有するものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなどの多糖類のほか、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラバン、マンノグルカン、キトサン、プルランなどの多糖の一部又は全部の水酸基に対してカルボキシル基を有する官能基を導入したものなどを用いることができる。

例えば、水酸基をカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化したものや、水酸基に多塩基酸の一のカルボキシル基をエステル結合させたものなどを好適に用いることができる。また、上記の多糖類をポリアルコール化した後に、カルボキシル基を有する官能基を導入したものを用いてもよい。本明細書において用いられる多糖誘導体という用語は、糖を構成要素として含む多糖化合物のほか、多糖化合物の環状糖部分を部分的又は完全に開環して得られる化合物（例えばポリアルコール化合物など）を含めて、最も広義に解釈する必要がある。これらの多糖誘導体のうち、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールやカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルプルランポリアルコールなどを用いることが好ましい。以下、本発明の薬物複合体の製造にカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを利用する場合についてより具体的に説明するが、本発明の薬物複合体における薬物担体はカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールに限定されることはない。

本発明の薬物担体の製造に用いるカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであって、DD S化合物としての使用に耐える程度のポリアルコール化がされていることが好ましい。

カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを製造するために用いるデキストランの種類は特に限定されず、 $\alpha$ -D-1,6-結合を任意の割合で含んでもよい。例えば、 $\alpha$ -D-1,6-結合の割合が85%以上、90%以上、又は95%以上のデキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば10,000程度から2,000,000程度のもの、好ましくは50,000程度から800,000程度のものを用いることができる。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル基を構成する  $C_{1-4}$  アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の  $C_{1-4}$  アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。

出発原料としてデキストランを用いる場合には、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを製造することができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、 $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\alpha$ -クロルプロピオン酸、 $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -メチル- $\beta$ -クロルプロピオン酸、 $\alpha$ -クロル酪酸、 $\beta$ -クロル酪酸、 $\gamma$ -クロル酪酸などのハロゲン化  $C_{1-4}$  アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部分的又は完全にカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化することにより行うことができる。

例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒（例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化  $C_{1-4}$  アルキルカルボン酸又はその塩を添加し、氷冷下ないし 100 °C 程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化  $C_{1-4}$  アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの水酸基に対するカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、構成糖残基あたり 0.01~2.0 の範囲、好ましくは 0.1~1.0 の範囲である。このようにして、カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールのナトリウム塩又はカリウム塩などのアルカリ金属塩の形態の水溶液を調製することができる。

上記のようにして調製されるアルカリ金属塩の形態の多糖誘導体のほか、有機アミンの塩の形態の多糖誘導体を薬物担体の原料として用いてもよい。有機アミンの塩の形態の多糖誘導体は、実質的に水を含まない有機溶媒中に高濃度に溶解できるので、この塩を用いると反応を非水系で行うことができ、反応効率を顕著に高めることができる場合がある。有機アミンの塩としては、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリエタノールアミンなどの脂肪族アミン類の塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジンなどの脂環式又は芳香族アミン類の塩、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウムなどの四級アンモニウム塩、などを用いることができる。

多糖誘導体のナトリウム塩から有機アミンの塩への変換は、イオン交換樹脂などを用いて行うことができる。例えば、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を水に溶解し、Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 メッシュ、 $H^+$  型) 樹脂を充填したカラムに付して水で溶出した後、トリエチルアミンなどの有機アミンを添加して凍結乾燥することができる。また、カルボキシメチルデキス

トランポリアルコールのナトリウム塩を水に溶解し、トリエチルアンモニウム型の樹脂を通過させることによって一工程で変換を行うことも可能である。

本発明の薬物複合体は、例えば、 $R'-NH-Y-CH_2-O-CO-Q$ （式中の定義は上記と同義である）で表される化合物を適宜の方法により製造し、必要に応じて保護基を除去した後、スパーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させることにより製造することができる。例えば、N-末端を保護したペプチド化合物を酸アミド結合により  $NH_2-Y-CH_2-OH$  のアミノ基に結合させ、必要に応じてペプチド鎖を延長した後、水酸基に  $CO-X$  部分又は  $CO-Q$  部分を導入することができる。 $CO-X$  部分を導入した場合には、さらに  $X$  を  $Q$  に変換すればよい。 $CO-X$  部分の導入に用いる反応剤としては、p-ニトロフェニルジカルボネート、p-ニトロフェニルクロロホルメート（ $X$  が p-ニトロフェノキシ基に相当する）、1,1'-カルボニルジイミダゾール（ $X$  がイミダゾイル基に相当する）などを用いることができる。 $CO-Q$  部分を導入する方法としては、 $Q$  にホスゲンを作用して得られる  $Cl-CO-Q$ 、 $Q$  に p-ニトロフェニルクロロホルメートを作用させて得られる  $X-CO-Q$ （ $X$  が p-ニトロフェノキシ基に相当する）などを用いることができる。また、 $R'-NH-Y-CH_2-O-CO-X$  を  $R'-NH-Y-CH_2-O-CO-Q$  に変換するときには、医薬化合物又は保護された医薬化合物を反応させるが、必要により、 $X$  と  $Q$  の種類に応じてトリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンなどの塩基や、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどの活性化剤を反応系に添加してもよい。その後、保護基の種類に応じて適宜の方法で保護基を除去することにより目的物を得ることができる。保護基の種類と除去の方法は、例えば、T.W. Green and P.G.M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis, 2nd ed.", John Wiley & Sons, Inc. (1991)などに記載されている。例えば、t-ブチルカルボニル基の場合には、トリフルオロ酢酸、酢酸、ギ酸などの酸類、好ましくはギ酸などの比較的弱い酸を用いることができ、トリチル基の場合には、酢酸などの酸類を用いることができる。9-フルオレニルメチルカルボキシ基の場合には、ピペラジンなどの塩基類を用いることができる。



酸アミド結合の形成には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、 $N,N'$ -ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のような  $N,N'$ -ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAPC)等のカルボジイミド誘導体、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾール誘導体のほか、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(EEDQ)などを用いることができる。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

多糖誘導体を用いた反応を非水系で行う場合には、実質的に水を含まない有機溶媒であって、反応種(多糖誘導体の有機アミンの塩及び遊離又は塩の形態の  $H-R-NH-Y-CH_2-O-CO-Q$ :  $H-R$  はN末端が保護されていないことを示す)を溶解することができるものならばいかなるものを用いてもよい。例えば、 $N,N$ -ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトアミド、 $N$ -メチルピロリドン、スルホランなどを用いることが好適である。薬物担体に導入される医薬化合物残基の量は特に限定されないが、医薬化合物残基の種類、並びに薬物複合体の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1~30重量%、好ましくは2~15重量%程度の範囲を選択することができる。薬物担体に導入された医薬化合物残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

なお、本発明の薬物複合体の製造方法のさらに具体的な例を実施例に示した。当業者は、上記の一般的な説明及び実施例の具体的説明を基にして、出発原料や反応試薬を適宜選択することにより、また必要に応じて反応条件や工程に適宜の修飾ないし改変を加えることにより、上記一般式(I)に包含される本発明の薬物複合体を製造することができる。

本発明の薬物複合体は、医薬化合物の残基の種類(例えば、抗腫瘍剤又は抗炎症剤などの医薬化合物の残基)に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。例えば、多糖誘導体部分としてカル

ボキシメチルデキストランポリアルコールを有する薬物複合体は極めて優れた血管透過性を有しており、腫瘍選択性及び炎症部位選択性を有している。

また、本発明の薬物複合体では、腫瘍部位や炎症部位においてプロテアーゼ（ペプチダーゼ）によりスペーサー部分が酵素的に加水分解されると、直ちにアミノベンジルオキシカルボニルアミドのウレタン結合が加水分解されるという特徴を有している。従って、本発明の薬物複合体では、遊離後の医薬化合物にスペーサー由来のアミノ酸が全く残存せず、医薬化合物自体の薬効が損なわれることがない。さらに、本発明の薬物複合体では、スペーサーの種類を選ぶことによって医薬化合物の適切な遊離速度を達成できるという特徴がある。

本発明の薬物複合体を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用又は点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、このような医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH 調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物残基を構成する医薬化合物の投与量、薬物複合体中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定すべきである。例えば、特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された抗腫瘍剤の残基が約 6 重量% 程度の割合で導入された薬物複合体を投与する場合には、非経口投与の場合には、一般に一日あたり体表面積  $1\text{ m}^2$  につき約 0.1~100 mg 程度、好ましくは約 1~30 mg の範囲で一回投与し、3~4 週毎に繰り返すことが好ましい。

別の観点から提供される本発明の化合物は、下記一般式(II)： $\text{R}'\text{-NH-Y-CH}_2\text{-O-CO-Q}$ （式中、 $\text{R}'$  は 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含み、N 末端が保護されているか又は保護されていない基を示し； $\text{Y}$  は置換基を有していてもよいフェニレン基を示し； $\text{Q}$  は医薬化合物の残基を示す）で表される。この化合物において、 $\text{Y}$  が無置換  $p$ -フェニレン基であり、 $\text{R}'$  が  $\text{H-Gly-Gly-Phe-Gly-}$  又は  $\text{H-Gly-Gly-Gly-Phe-}$  で表される基であり、医薬化合物が

(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである化合物が好ましい。

また、下記の一般式(III)： $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-X$ 〔式中、Aは薬物担体である高分子を示し；Rは1個のアミノ酸を含むスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーを示し；Yは置換基を有していてもよいフェニレン基を示し；Xは水酸基、 $-O-M$ （Mはカルボキシ基の保護基を示す）、又は脱離基を示す〕で表される化合物も本発明により提供される。カルボキシ基の保護基の種類は特に限定されず、当業者に利用可能なものであればいかなるものを用いてもよい。また、脱離基はカルボニル炭素上での置換反応において脱離基として作用するものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、塩素原子、臭素原子などのハロゲン原子、エトキシ基などのアルコキシ基、p-トルエンスルホンオキシ基などのアリアルスルホンオキシ基などを挙げることができる。なお、式(II)又は式(III)におけるY、Q、又はRなどの記号は式(I)についてすでに説明したものと同義である。式(II)又は式(III)で表されるこれらの化合物は、本発明の薬物複合体の製造用中間体として有用である。

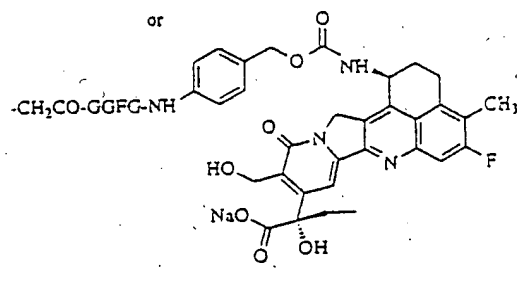
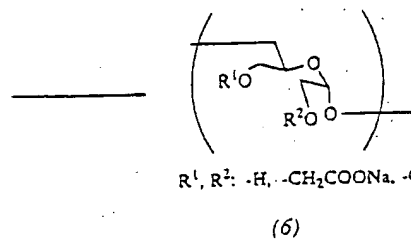
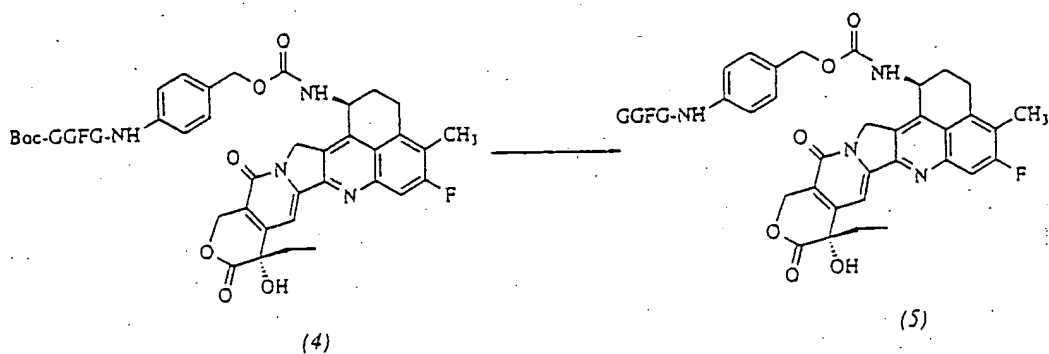
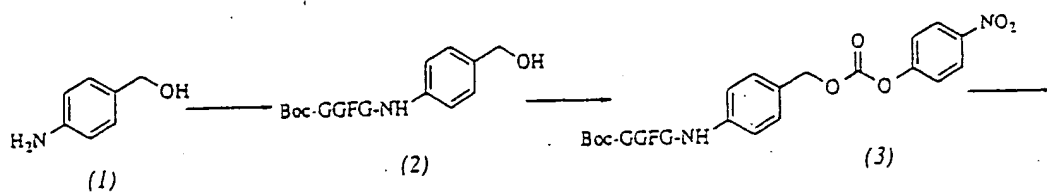
#### 実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

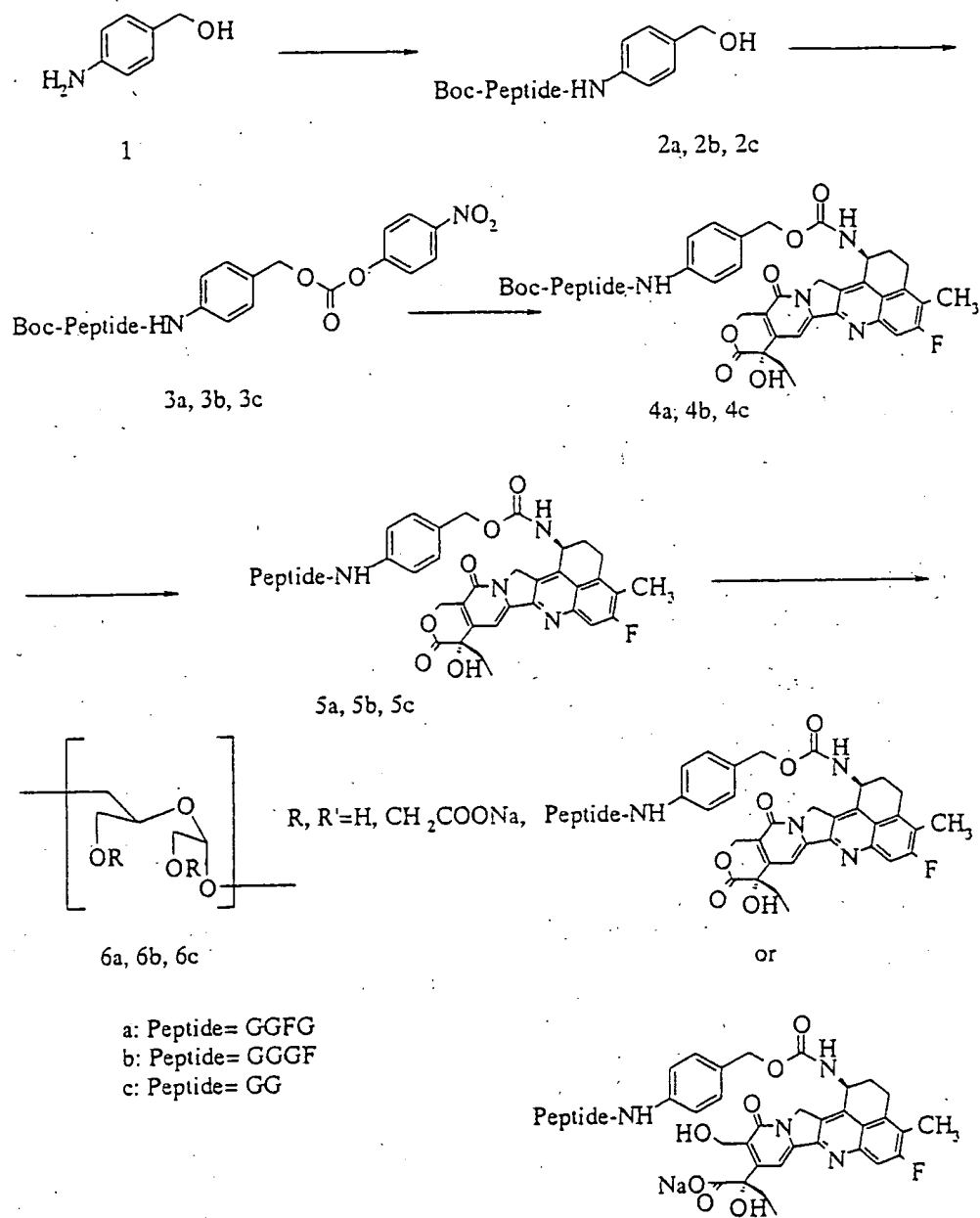
実施例中、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2(H<sup>+</sup>)型カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレ

ンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を  $s(\text{mg})$ 、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を  $a(\text{ml})$ 、0.1N 塩酸の滴定量を  $b(\text{ml})$  とし、カルボキシメチル化度を  $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$  の式により求めた。また、薬物の導入量（重量%）は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析（362 nm 付近）から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った（カラム：TSK gel G4000 PW<sub>XL</sub>、溶離液：0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min、カラム温度：40°C）。

また、DX-8951 は特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された医薬化合物〔(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン〕であり、-CO-DX-8951 は該医薬化合物の 1-位アミノ基が -CO- で表されるカルボニル基とペプチド結合を形成していることを示す。DX-8951 はラクトン環が閉環型若しくは開環型のいずれか又はそれらの混合形態として存在していることを理解すべきである。また、下記スキームに示された糖鎖の構成単位には 1 個又は 2 個のカルボキシメチル基が導入されているが、これは糖鎖の構成単位の一例を示したものであり、本発明の薬物複合体の薬物担体部分が上記構成単位の繰返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。なお、実施例中の化合物番号は以下のスキーム中の化合物番号に対応させてある。例えば、実施例 5 中の化合物 2a はスキーム中の化合物 2a に対応し、このスキーム中の構造式のペプチド部分が GGFG の化合物を表している（スキーム中、Peptide=GGFG と記載されている）。



Boc = (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>COCO-



例 1 : カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX8951 の合成

デキストラン T500(20 g, ファルマシア社製, 分子量 500K)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 2000 ml)に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)

を加えた。遮光しながら 4℃で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えて溶解した後、一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH5.5 に調整して 4℃で 1 時間攪拌した後、8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いて限外濾過法による脱塩を行なった。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール(10.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は 159K であった。

このデキストランポリアルコール(7.5 g)を、水酸化ナトリウム(31.5 g)を水(225 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(45 g)を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(8.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は 274K であり、カルボキシメチル化度は 0.4 であった。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (875 mg)、4-アミノベンジルアルコール(492 mg)、N,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)の混合物に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(989 mg)を加えた。室温で一晩攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=96:4 溶液)で精製して化合物(2)を 800 mg 得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.73 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.17 (d, 1H, J=7.2Hz), 7.91-7.93 (m, 1H), 7.56 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.24-7.26 (m, 4H), 7.24 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.17-7.20 (m, 1H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.66-3.94 (m, 3H), 3.63 (dd, 1H, J=4.8, 16.7Hz), 3.56 (d, 2H, J=5.6Hz), 3.09 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.83 (dd, 1H, J=9.6, 13.5Hz), 1.38 (s, 9H).

化合物(2)(465 mg)、ビス(4-ニトロフェニル)カルボネート(522 mg)、ジイソプロピルエチルアミン(0.224 ml)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(10.5 mg)及びテトラヒドロフラン(3 ml)の混合物を室温で4日間攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=99:1 溶液)で精製して化合物(3)を205 mg得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 9.88 (s, 1H), 8.40-8.42 (m, 1H), 8.31 (d, 2H,  $J=9.5\text{Hz}$ ), 8.27-8.28 (m, 1H), 7.92-7.94 (m, 1H), 7.67 (d, 2H,  $J=7.9\text{Hz}$ ), 7.55 (d, 2H,  $J=9.5\text{Hz}$ ), 7.41 (d, 2H,  $J=7.9\text{Hz}$ ), 7.24-7.26 (m, 4H), 7.17-7.20 (m, 1H), 6.93-6.95 (m, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.50-4.53 (m, 1H), 3.77-3.95 (m, 3H), 3.61-3.66 (m, 1H), 3.55-3.57 (m, 2H), 3.08 (dd, 1H,  $J=4.8, 13.5\text{Hz}$ ), 2.83 (dd, 1H,  $J=9.5, 13.5\text{Hz}$ ), 1.38 (s, 9H).

化合物(3)(185 mg)、DX-8951 のメタンスルホン酸塩(152 mg)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(54 mg)、ジイソプロピルエチルアミン(0.093 ml)及び N,N-ジメチルホルムアミド(20 ml)の混合物を室温で2日間攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=96:4 溶液)で精製し、得られた黄色固体を再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:0.5%酢酸を含むジクロロメタン:メタノール=97:3 溶液)で精製して化合物(4)を130 mg得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 9.84 (s, 1H), 8.40-8.41 (m, 1H), 8.19 (d, 1H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 8.04 (d, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 7.92-7.93 (m, 1H), 7.74 (d, 1H,  $J=11.1\text{Hz}$ ), 7.63 (d, 2H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 7.37 (d, 2H,  $J=8.0\text{Hz}$ ), 7.32 (s, 1H), 7.24-7.26 (m, 4H), 7.16-7.20 (m, 1H), 6.94-6.95 (m, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.46 (d, 1H,  $J=16.7\text{Hz}$ ), 5.41 (d, 1H,  $J=16.7\text{Hz}$ ), 5.24-5.34 (m, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.49-4.52 (m, 1H), 3.92 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.85 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.78 (dd, 1H,  $J=5.6, 16.7\text{Hz}$ ), 3.63 (dd, 1H,  $J=4.8, 16.7\text{Hz}$ ), 3.54-3.56 (m, 1H), 3.31-3.33 (m,



2H), 3.08 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.83 (dd, 1H, J=10.3, 13.5Hz), 2.38 (s, 3H), 1.86-1.89 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=7.2Hz)

Mass (FAB); m/e 797 (M+1)

化合物(4)(98 mg)をトリフルオロ酢酸(1.5 ml)に溶かし、1.5 時間放置した。反応液をエーテル(30 ml)に滴下し、沈殿を濾取した。エーテルで洗浄して化合物(5) を 100 mg 得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.86 (s, 1H), 8.48-8.61 (m, 2H), 8.37 (d, 1H, J=8.3Hz), 8.00-8.20 (m, 1H), 7.75 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.66 (d, 2H, J=8.8Hz), 7.41 (d, 2H, J=8.8Hz), 7.37 (s, 1H), 7.24-7.27 (m, 4H), 7.17-7.19 (m, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.72 (d, 1H, J=19.0Hz), 5.33-5.48 (m, 3H), 5.23-5.30 (m, 1H), 5.08-5.11 (m, 2H), 4.58-4.61 (m, 1H), 3.84-3.99 (m, 3H), 3.71 (dd, 1H, J=4.9, 16.6Hz), 3.56-3.66 (m, 2H), 3.22-3.30 (m, 1H), 3.12-3.18 (m, 1H), 3.09-3.11 (m, 1H), 2.78-2.83 (m, 1H), 2.46-2.57 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 2.18-2.23 (m, 1H), 1.82-1.93 (m, 2H), 0.90 (t, 3H, J=7.3Hz)

化合物(5)(95 mg)を水(5 ml)とメタノール(10 ml)に溶解した。この溶液を、上で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(600 mg)を水(10 ml)とメタノール(20 ml)に溶かした溶液に加えた。水溶性カルボジイミド(26 mg)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(15 mg)を加えた後、0.1 規定水酸化ナトリウム水溶液で pH を 7.0 に調整した。室温で 2 時間攪拌した後、水溶性カルボジイミド(13 mg)を加え、室温で一晩反応させた。反応液に水(500 ml)を加えた後、限外濾過膜 10K(フィルترون社製)を用いて限外濾過した。膜を通過しない残留溶液を 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液で pH9 とし、濾過膜(0.16 μm、フィルترون社製)を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して化合物(6)を 490 mg 得た。本化合物を

0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム：東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒：0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1M トリス緩衝液, pH 10.0, 0.20 mg/ml) をそれぞれ図1及び図2に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液(pH 10.0)：アセトニトリル=7：3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 2.3% (W/W)であった。

#### 例2：薬物複合体からの医薬化合物の遊離

37°Cの Meth A (murine fibrosarcoma Meth A)ホモジネート中又は緩衝液中に例1で得た薬物複合体を溶解し (378  $\mu$ g/ml)、20 時間後に遊離された DX-8951 を定量した。スパーサーと DX-8951 とを p-アミノベンジルオキシカルボニル基を介さずに結合した化合物を製造して比較化合物として用いた。結果を表1に示す。薬物遊離量は用いた薬物複合体中の薬物量に対する遊離した薬物量(%)で示した。本発明の薬物複合体は、弱酸性のホモジネート中で速やかに遊離されたが、緩衝液中ではほとんど遊離されなかった。一方、比較化合物は弱酸性のホモジネート中でごく少量遊離されたが、緩衝液中では全く遊離されなかった。

表1

反 応 系	例1の化合物	比較化合物
Meth A ホモジネート(pH 4.5)	37.7	0.106
Meth A ホモジネート(pH 5.5)	38.1	0.034
Meth A ホモジネート(pH 6.5)	4.25	0.000
緩衝液 (pH 4.5)	0.190	0.000
緩衝液 (pH 5.5)	0.178	0.000
緩衝液 (pH 6.5)	0.171	0.000
緩衝液 (pH 7.5)	0.138	—
マウス血漿	0.186	—

— : 試験せず

例3：Meth A 担癌マウスに対する例1の薬物複合体の最大耐量 (MTD、Maximum Tolerated Dose)

Meth A 細胞を BALB/c 系マウスに移植して Meth A 担癌マウスを作成し、20 日目に例1の薬物複合体を単回投与した。投与後、経時的に体重測定、毒性死の有無の観察を実施し、最大体重減少率、死亡率を表2にまとめた。投与量は DX-8951 の無水遊離塩基の重量に換算したものを示す。2.5 mg/kg 投与時においてわずかな体重減少、10 mg/kg 投与時において全例の毒性死が観察されたことから、例1の MTD を 5 ~7.5 mg/kg と判断した。

表2

化合物	投与量 (mg/kg)	BWLmax <sup>a</sup> (%) [day]	N <sup>b</sup>
対照	0	<0	0/2
例1	30	17.9[22]	2/2
	10	32.8[26]	2/2
	2.5	2.2[22]	0/2
	0.625	<0	0/2
	0.156	<0	0/2

<sup>a</sup> 体重の最大減少率 (カッコ内は最大減少が観測された日)

<0 は体重減少が観察されなかったことを示す。

<sup>b</sup> 死亡したマウス/使用したマウス

例4：例1の薬物複合体の抗腫瘍活性

Meth A 細胞 (murine fibrosarcoma Meth A) を BALB/c 系マウスに移植して Meth A 担癌マウスを作成し、移植後7日目に例1の薬物複合体を単回投与した。腫瘍の重量を21日目に測定して、腫瘍に対する抑制効果と毒性を評価した。結果を表3に示す。表中、\* はダネット検定で有意差ありを示し (\*\*\* P<0.001, \*\*

P<0.01)、投与量は DX-8951 の無水遊離塩基の重量に換算したものを示し、IR は腫瘍の縮小率を示す。例 1 の薬物複合体が用量依存的に腫瘍の縮小効果を発揮することが明らかである。

表 3

化合物	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 平均値 (g)	IR(%)	BWLmax <sup>a</sup> (%)[day]	N <sup>b</sup>
対照	0	2.315±0.366	0	<0	0/6
例 1 (本発明)	7.5	0.008±0.002***	100	24.8[15]	2/6
	5	0.019±0.004***	99	2.9[13]	0/6
	2.5	0.061±0.016***	97	<0	0/6
	1.25	0.610±0.180***	74	0.3[8]	0/6
	0.625	1.247±0.280**	46	<0	0/6

<sup>a</sup> 体重の最大減少率 (カッコ内は最大減少が観測された日)

<sup>b</sup> 死亡したマウス/使用したマウス

例 5 : 脱保護剤としてギ酸を用いた、カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX8951 の合成

デキストラン T500(20 g, ファルマシア社製, 分子量 500K)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 2000 ml)に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光しながら 4℃で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えて溶解した後、一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH5.5 に調整して 4℃で 1 時間攪拌した後、8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いて限外濾過法による脱塩を行なった。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール(10.5 g)を得た。この物質の分子

量(ゲル濾過、ブルラン標準)は159Kであった。

このデキストランポリアルコール(7.5 g)を、水酸化ナトリウム(31.5 g)を水(225 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(45 g)を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(8.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、ブルラン標準)は274Kであり、カルボキシメチル化度は0.4であった。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (875 mg)、4-アミノベンジルアルコール (492 mg)、N, N-ジメチルホルムアミド(10 ml)の混合物に、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (989 mg)を加えた。室温で一晩攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=96:4 溶液)で精製して化合物 2a(800 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.73 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.17 (d, 1H, J=7.2Hz), 7.91-7.93 (m, 1H), 7.56 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.24-7.26 (m, 4H), 7.24 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.17-7.20 (m, 1H), 4.50-4.54 (m, 1H), 4.44 (s, 2H), 3.66-3.94 (m, 3H), 3.63 (dd, 1H, J=4.8, 16.7Hz), 3.56 (d, 2H, J=5.6Hz), 3.09 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.83 (dd, 1H, J=9.6, 13.5Hz), 1.38 (s, 9H).

化合物 2a(465 mg)、ビス(4-ニトロフェニル)カルボネート(522 mg)、ジイソプロピルエチルアミン(0.224 ml)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(10.5 mg)及びテトラヒドロフラン(3 ml)の混合物を室温で4日間攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=99:1 溶液)で精製して化合物 3a(205 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.88 (s, 1H), 8.40-8.42 (m, 1H), 8.31(d, 2H, J=9.5Hz), 8.27-8.28 (m, 1H), 7.92-7.94 (m, 1H), 7.67 (d, 2H, J=7.9Hz), 7.55 (d, 2H,

J=9.5Hz), 7.41 (d, 2H, J=7.9Hz), 7.24-7.26 (m, 4H), 7.17-7.20 (m, 1H), 6.93-6.95 (m, 1H), 5.25 (s, 1H), 4.50-4.53 (m, 1H), 3.77-3.95 (m, 3H), 3.61-3.66 (m, 1H), 3.55-3.57 (m, 2H), 3.08 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.83 (dd, 1H, J=9.5, 13.5Hz), 1.38 (s, 9H).

化合物 3a(185 mg)、DX-8951 のメタンスルホン酸塩(152 mg)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(54 mg)、ジイソプロピルエチルアミン(0.093 ml)及び N, N-ジメチルホルムアミド(20 ml)の混合物を室温で 2 日間攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液:ジクロロメタン:メタノール=96:4 溶液) で精製した。得られた黄色固体をもう一度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液:0.5%酢酸を含むジクロロメタン:メタノール=97:3 溶液) で精製してして化合物 4a(130 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.84 (s, 1H), 8.40-8.41 (m, 1H), 8.19 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.04 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.92-7.93 (m, 1H), 7.74 (d, 1H, J=11.1Hz), 7.63 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.37 (d, 2H, J=8.0Hz), 7.32 (s, 1H), 7.24-7.26 (m, 4H), 7.16-7.20 (m, 1H), 6.94-6.95 (m, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.46 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.41 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.24-5.34 (m, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.49-4.52 (m, 1H), 3.92 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.85 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.78 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.63 (dd, 1H, J=4.8, 16.7Hz), 3.54-3.56 (m, 1H), 3.31-3.33 (m, 2H), 3.08 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.83 (dd, 1H, J=10.3, 13.5Hz), 2.38 (s, 3H), 1.86-1.89 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=7.2Hz).

化合物 4a(200 mg)をギ酸(4 ml)に溶かし、2 時間放置した。反応液をエーテル(40 ml)に滴下した。沈澱をエーテルで洗浄して化合物 5a(198 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.90 (s, 1H), 8.48-8.50 (m, 1H), 8.33-8.36 (m, 1H), 8.27-8.30 (m, 2H), 8.00-8.08 (m, 1H), 7.74-7.76 (m, 1H), 7.63 (d, 1H, J=8.2Hz), 7.31-7.39 (m, 3H), 7.21-7.25 (m, 5H), 7.15-7.20 (m, 1H), 5.43-5.48 (m, 2H),

5.22-5.33 (m, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.51-4.53 (m, 1H), 3.93 (dd, 1H,  $J=5.5$ , 16.5Hz), 3.80-3.90 (m, 2H), 3.64-3.72 (m, 3H), 3.20-3.25 (m, 1H), 3.09-3.13 (m, 1H), 3.07 (dd, 1H,  $J=4.1$ , 13.8Hz), 2.81 (dd, 1H,  $J=10.1$ , 13.8Hz), 2.37 (s, 3H), 2.15-2.22 (m, 2H), 1.82-1.88 (m, 2H), 0.88 (t, 3H,  $J=7.3$ Hz)

化合物 5a(190 mg)を水(5 ml)とメタノール(10 ml)に溶解した。この溶液を、例1で得たカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(10 ml)とメタノール(5 ml)に溶かした溶液に加えた。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(44 mg)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(39 mg)を加えた後、0.1 規定水酸化ナトリウム水溶液で pH を 7.0 に調整した。室温で3時間攪拌した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(22 mg)を加えた。室温で1.75時間攪拌した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(11 mg)を加え、室温で一晩反応させた。反応液を 0.1 規定水酸化ナトリウム水溶液で pH を 8.9 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥した。得られたアモルファスを、Sep-Pak  $C_{18}$  カートリッジ (ウオーターズ社製) 及び Bio-Rad AG50W-X8(Na<sup>+</sup> form)カラムで精製した後、再度バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して化合物 6a(700 mg)を得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 20%アセトニトリル含有 0.1M NaCl 水溶液、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1M トリス緩衝液, pH 9.0, 0.10 mg/ml)をそれぞれ図3及び図4に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0): アセトニトリル=7:3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 3.3% (W/W)であった。

例6：脱保護剤としてギ酸を用いた、カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX8951の合成

デキストラン T500(20 g, ファルマシア社製, 分子量 500K)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 2000 ml)に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光しながら 4 °Cで 10 日間攪拌した後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えて溶解した後、一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH5.5 に調整して 4 °Cで 1 時間攪拌した後、8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いて限外濾過法による脱塩を行なった。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール(10.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は 159K であった。

このデキストランポリアルコール(7.5 g)を、水酸化ナトリウム(31.5 g)を水(225 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(45 g)を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(8.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は 274K であり、カルボキシメチル化度は 0.4 であった。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH (1000 mg)、4-アミノベンジルアルコール (324 mg)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(464 mg)、N, N-ジメチルホルムアミド(10 ml)の混合物に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(571 mg)を加えた。室温で一晩攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=92:8 溶液)で精製して化合物 2b(1220 mg)を得た。



$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 9.91 (s, 1H), 8.25 (d, 1H,  $J=3.7\text{Hz}$ ), 8.08-8.20 (m, 2H), 7.54 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.25-7.29 (m, 4H), 7.23 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.16-7.21 (m, 1H), 6.95 (t, 1H,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 5.08 (d, 1H,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 4.62-4.67 (m, 1H), 4.44 (d, 2H,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 3.74 (dd, 1H,  $J=4.9, 5.4\text{Hz}$ ), 3.65 (dd, 1H,  $J=5.9, 16.6\text{Hz}$ ), 3.59 (d, 2H,  $J=5.4\text{Hz}$ ), 3.07 (dd, 1H,  $J=5.4, 13.7\text{Hz}$ ), 2.90 (dd, 1H,  $J=9.3, 13.7\text{Hz}$ ), 1.37 (s, 9H).

化合物 2b(1160 mg)、ビス (4-ニトロフェニル) カルボネート(1303 mg)、ジイソプロピルエチルアミン(0.555 ml)、4-(ジメチルアミノ)ピリジン(26 mg)及びテトラヒドロフラン(0 ml)の混合物を室温で4日間攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液:ジクロロメタン:メタノール=96:4 溶液) で精製して化合物 3b(650 mg)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 10.07 (s, 1H), 8.31 (d, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 8.24-8.25 (m, 1H), 8.09-8.12 (m, 2H), 7.65 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.56 (d, 2H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 7.42 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.27-7.28 (m, 5H), 7.18-7.19 (m, 1H), 6.95 (s, 1H), 5.68-5.73 (m, 1H), 5.25 (s, 2H), 4.64-4.69 (m, 1H), 3.58-3.79 (m, 6H), 3.08 (dd, 1H,  $J=4.9, 13.7\text{Hz}$ ), 2.91 (dd, 1H,  $J=9.8, 13.7\text{Hz}$ ), 1.37 (s, 9H).

化合物 3b(576 mg)、DX-8951 のメタンスルホン酸塩(497 mg)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(113 mg)、ジイソプロピルエチルアミン(0.303 ml)及び N,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)の混合物を室温で一晩攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液:0.5%酢酸を含むジクロロメタン:メタノール=92:8 溶液) で精製して化合物 4b(290 mg)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 10.01 (s, 1H), 8.24 (d, 1H,  $J=9.8\text{Hz}$ ), 8.09-8.13 (m, 2H), 8.05 (d, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 7.74 (d, 1H,  $J=10.7\text{Hz}$ ), 7.61 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.37 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.32 (s, 1H), 7.24-7.27 (m, 4H), 7.17-7.19 (m, 1H), 6.94

(s, 1H), 5.47 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.42 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.31 (d, 1H, J=19.5Hz), 5.27-5.29 (m, 1H), 5.24 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.09 (s, 2H), 4.62-4.67 (m, 1H), 3.73-3.78 (m, 2H), 3.66 (d, 1H, J=5.4Hz), 3.63 (d, 1H, J=5.4Hz), 3.53-3.59 (m, 2H), 3.23-3.27 (m, 2H), 3.07 (dd, 1H, J=4.9, 13.7Hz), 2.90 (dd, 1H, J=9.8, 13.7Hz), 2.37 (s, 3H), 2.17-2.23 (m, 2H), 1.81-1.90 (m, 2H), 1.36 (s, 9H), 0.89 (d, 1H, J=6.8Hz).

化合物 4b(200 mg)をギ酸(4 ml)に溶かし、2 時間放置した。反応液をエーテル(40 ml)に滴下した。沈澱をエーテルで洗浄して化合物 5b(198 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 10.06 (s, 1H), 8.20-8.41 (m, 3H), 8.07 (d, 1H, J=8.7Hz), 7.75 (d, 1H, J=7.8Hz), 7.61 (d, 2H, J=8.3Hz), 7.37 (d, 2H, J=8.3Hz), 7.32 (s, 1H), 7.21-7.30 (m, 5H), 7.18-7.20 (m, 1H), 5.41-5.48 (m, 2H), 5.23-5.33 (m, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.62-4.65 (m, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.72-3.76 (m, 1H), 3.63 (dd, 1H, J=5.0, 16.5Hz), 3.58-3.60 (m, 1H), 3.40 (dd, 1H, J=6.9, 13.7Hz), 3.20-3.23 (m, 1H), 3.10-3.13 (m, 1H), 3.06 (dd, 1H, J=5.0, 13.7Hz), 2.90 (dd, 1H, J=9.6, 13.7Hz), 2.37 (s, 3H), 2.15-2.22 (m, 2H), 1.84-1.90 (m, 2H), 0.88 (d, 1H, J=6.9Hz).

化合物 5b(100 mg)を水(5 ml)とメタノール(10 ml)に溶解した。この溶液を、例 1 で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1100 mg)を水(10 ml)とメタノール(20 ml)に溶かした溶液に加えた。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(15 mg)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(26 mg)を加えた後、0.1 規定水酸化ナトリウム水溶液で pH を 7.0 に調整した。室温で 2 時間攪拌した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(25 mg)を加えた。室温で 1.5 時間攪拌した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(13 mg)を加え、室温で一晩反応させた。反応液を 0.1 規定水酸化ナトリウム水溶液で pH を 8.5 に調整した後、バイ

オマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥した。得られたアモルファスを、Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジ (ウオーターズ社製) 及び Bio-Rad AG50W-X8(Na<sup>+</sup> form) カラムで精製した後、再度バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22  $\mu$ m)で濾過した後、凍結乾燥して化合物 6b(405 mg)を得た。本化合物の医薬化合物残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) : アセトニトリル=7:3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 1.7% (W/W)であった。

例 7 : 脱保護剤としてギ酸を用いた、カルボキシメチルデキストランポリアルコール-Gly-Gly-NH-p-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CO-DX8951 の合成

デキストラン T500(20 g, ファルマシア社製, 分子量 500K)を 0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5, 2000 ml)に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光しながら 4°C で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7 に調整した。水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えて溶解した後、一晩攪拌した。反応液を氷冷し、酢酸で pH5.5 に調整して 4°C で 1 時間攪拌した後、8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いて限外濾過法による脱塩を行なった。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥して、デキストランポリアルコール(10.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、ブルラン標準)は 159K であった。

このデキストランポリアルコール(7.5 g)を、水酸化ナトリウム(31.5 g)を水(225 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(45 g)を加えて溶解させた後、室温で一晩反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥してカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(8.5 g)を得た。この物質の分子量(ゲ

ル濾過、プルラン標準)は274Kであり、カルボキシメチル化度は0.4であった。

Boc-Gly-Gly-OH (2.3 g)、4-アミノベンジルアルコール (2.0 g)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(3.29 g)、N, N-ジメチルホルムアミド(20 ml)の混合物に、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(4.05 g)を加えた。室温で一晩攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液:ジクロロメタン:メタノール=94:6 溶液)で精製して化合物 2c(2.9 g)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.75 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.54 (d, 2H, J=8.3Hz), 7.23 (d, 2H, J=8.3Hz), 7.07 (s, 1H), 5.09 (t, 1H, J=8.6Hz), 4.44 (d, 2H, J=8.6Hz), 3.88 (s, 2H), 3.60 (s, 1H), 1.39 (s, 9H).

化合物 2c(1.0 g)、ビス (4-ニトロフェニル) カルボネート(2.72 g)、ジイソプロピルエチルアミン(1.17 ml)、4- (ジメチルアミノ) ピリジン(55 mg)及びテトラヒドロフラン(50 ml)の混合物を室温で3日間攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液:ジクロロメタン:メタノール=96:4 溶液)で精製して化合物 3c(376 mg)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 9.92 (s, 1H), 8.31 (d, 1H, J=9.3Hz), 8.14-8.25 (m, 2H), 7.65 (d, 2H, J=8.3Hz), 7.56 (d, 2H, J=9.3Hz), 7.41 (d, 2H, J=8.3Hz), 7.05 (d, 1H, J=5.4Hz), 5.25 (s, 2H), 3.91 (d, 2H, J=4.9Hz), 3.61 (d, 2H, J=5.4Hz), 1.40 (s, 9H).

化合物 3c(338 mg)、DX-8951 のメタンスルホン酸塩(400 mg)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(109 mg)、ジイソプロピルエチルアミン(0.243 ml)及び N, N-ジメチルホルムアミド(20 ml)の混合物を室温で一晩攪拌しながら反応させた後、反応液を減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液:0.5%酢酸を含むジクロロメタン:メタノール=94:6 溶液)で精製してして化合物 4c(460 mg)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 9.84 (s, 1H), 8.13-8.15 (m, 1H), 8.04 (d, 1H,  $J=8.8\text{Hz}$ ), 7.73 (d, 1H,  $J=10.7\text{Hz}$ ), 7.60 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.37 (d, 2H,  $J=8.3\text{Hz}$ ), 7.32 (s, 1H), 7.04 (d, 1H,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 6.48 (s, 1H), 5.46 (d, 1H,  $J=16.1\text{Hz}$ ), 5.41 (d, 1H,  $J=16.1\text{Hz}$ ), 5.31 (d, 1H,  $J=19.0\text{Hz}$ ), 5.26-5.29 (m, 1H), 5.24 (d, 1H,  $J=19.0\text{Hz}$ ), 5.08 (s, 2H), 3.90 (d, 2H,  $J=4.9\text{Hz}$ ), 3.61 (d, 2H,  $J=5.9\text{Hz}$ ), 3.07-3.12 (m, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.15-2.23 (m, 2H), 1.83-1.92 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 0.89 (d, 1H,  $J=7.3\text{Hz}$ ).

化合物 4c(100 mg)をギ酸(4 ml)に溶かし、2 時間放置した。反応液をエーテル(40 ml)に滴下した。沈澱をエーテルで洗浄して化合物 5c(98 mg)を得た。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$ : 10.02 (s, 1H), 8.24-8.30 (m, 3H), 8.05-8.09 (m, 1H), 7.73-7.76 (m, 2H), 7.59 (d, 2H,  $J=6.6\text{Hz}$ ), 7.34-7.38 (m, 3H), 6.51 (s, 1H), 5.41-5.49 (m, 2H), 5.24-5.31 (m, 3H), 5.08 (s, 2H), 3.95 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 3.07-3.14 (m, 2H), 2.39 (s, 3H), 2.14-2.28 (m, 2H), 1.86-1.90 (m, 2H), 0.90 (d, 1H,  $J=6.0\text{Hz}$ ).

化合物 5c(95 mg)を水(15 ml)とメタノール(15 ml)に溶解した。この溶液を、例 1 で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1000 mg)を水(15 ml)とメタノール(15 ml)に溶かした溶液に加えた。1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(28 mg)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(53 mg)を加えた後、0.1 規定水酸化ナトリウム水溶液で pH を 7.0 に調整した。室温で 3 時間攪拌した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(26 mg)を加えた。室温で 1.5 時間攪拌した後、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(12 mg)を加え、室温で一晩反応させた。反応液を 0.1 規定水酸化ナトリウム水溶液で pH を 8.5 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター( $0.22\mu\text{m}$ )で濾過した後、凍結乾燥した。得られたアモル

ファスを、Sep-Pak C<sub>18</sub> カートリッジ (ウオーターズ社製) 及び Bio-Rad AG50W-X8(Na<sup>+</sup> form) カラムで精製した後、再度バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して化合物 6c(588 mg)を得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 20% アセトニトリル含有 0.1M NaCl 水溶液、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1M トリス緩衝液, pH 9.0, 0.12 mg/ml) をそれぞれ図 5 及び図 6 に示す。本化合物の医薬化合物残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0): アセトニトリル=7:3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 3.3% (W/W)であった。

#### 例 8 : 薬物複合体からの医薬化合物の遊離

37°Cの Meth A (murine fibrosarcoma Meth A)ホモジネート中又は緩衝液中に例 5、6、及び7で得た薬物複合体を溶解し (50 μg/ml)、20 時間後に遊離された DX-8951 を定量した。スパーサーと DX-8951 とを p-アミノベンジルオキシカルボニル基を介さずに結合した化合物を製造して比較化合物として用いた。結果を表 4 に示す。薬物遊離量は用いた薬物複合体中の薬物量に対する遊離した薬物量(%)で示した。例 5、6、及び7の薬物複合体は、弱酸性のホモジネート中で速やかに遊離されたが、緩衝液中ではほとんど遊離されなかった。一方、比較化合物は弱酸性のホモジネート中ごく少量遊離されたが、緩衝液中では全く遊離されなかった。

表 4

	例 5	例 6	例 7	比較化合物
MethA ホモジネート(pH4.5)	110.69	15.48	0.44	0.85
MethA ホモジネート(pH 5.5)	110.31	4.97	0.37	0.12
MethA ホモジネート(pH 6.5)	42.71	1.78	0.55	0.01
緩衝液(pH 4.5)	0.79	0.12	0.15	0.00
緩衝液(pH 5.5)	0.71	0.19	0.12	0.00
緩衝液(pH 6.5)	0.8	0.23	0.16	0.00
血漿	0.13	0.51	0.12	0.00

例 9 : Meth A 担癌マウスに対する例 5、例 6、及び例 7 の薬物複合体の最大耐量 (MTD、Maximum Tolerated Dose)

Meth A 細胞を BALB/c 系マウスに移植して Meth A 担癌マウスを作成し、13 日目に例 5、例 6 及び例 7 で得た薬物複合体を単回投与した。投与後、経時的に体重測定、毒性死の有無の観察を実施し、最大体重減少率、死亡率を表 5 にまとめた。投与量は DX-8951 の無水遊離塩基の重量に換算したものを示す。

表 5

化合物	投与量 (mg/kg)	BWL <sub>max</sub> <sup>a</sup> (%) [day]	N <sup>b</sup>
対照	0	<0	0/3
例 5	10	27.1[18]	3/3
	5	28.6[18]	3/3
	2.5	28.9[20]	3/3
	1.25	5.0[18]	0/3
	0.625	2.0[14]	0/3
	10	27.1[18]	3/3
例 6	5	24.0[18]	3/3
	2.5	22.1[20]	0/3
	1.25	2.4[14]	0/3
	30	14.6[16]	3/3
例 7	20	14.2[16]	3/3
	10	13.7[16]	3/3
	5	25.4[18]	3/3
	2.5	31.0[21]	3/3

<sup>a</sup> 体重の最大減少率（カッコ内は最大減少が観測された日）

<0 は体重減少が観察されなかったことを示す。

<sup>b</sup> 死亡したマウス／使用したマウス

体重減少及び死亡例が観察された投与量から、各複合体の MTD を以下のように判断した。



表 6

	MTD (mg/kg)
例 5	1.25~2.5
例 6	2.5
例 7	<2.5

例 5 で得た薬物複合体の MTD は例 1 で得た薬物複合体の MTD (例 3 参照) の約 1/3 であり、例 1 で得た薬物複合体を用いた場合の DX-8951 の遊離率 (例 2 の表参照) が、例 5 で得た薬物複合体を用いた場合の DX-8951 の遊離率の約 1/3 (例 8 の表参照) であることと、相関していた。

#### 例 10 : 例 5 及び例 6 に示した複合体の抗腫瘍活性

Meth A 細胞を BALB/c 系マウスに移植して Meth A 担癌マウスを作成し、移植後 7 日目に例 1, 例 5 及び例 6 で示した薬物複合体を単回投与した。腫瘍の重量を 21 日目に測定して、腫瘍に対する抑制効果と毒性を評価した。結果を表に示す。表中、\*はタネット検定で有意差有りを示し (\*\*P<0.001、\*\*P<0.01、\*P<0.05)、投与量は DX-8951 の無水遊離塩基の重量に換算したものを示し、IR は腫瘍の縮小率を示す。例 5 及び例 6 で示した薬物複合体が用量依存的に腫瘍の縮小効果を発揮することが明らかである。

また、例 5 で示した薬物複合体の最小有効用量は、例 1 で示した薬物複合体の最小有効用量の約 1/3 であり、腫瘍ホモジネート中での DX-8951 の遊離率 (例 2 の表及び例 8 の表参照) 及び Meth A 担癌マウスでの MTD (例 3 の表及び例 9 参照) において、同様な乖離が観察されたことと相関していた。

表 7

化合物	投 与 量 (mg/kg)	腫瘍重量平均値 (g)	IR(%)	BWLmax <sup>a</sup> (%)[day]	N <sup>b</sup>
対照	0	2.624±0.417	0	<0	0/6
例 1	7.5	0.005±0.003 ***	100	26.1[16]	2/6
	5	0.004±0.001 ***	100	4.0[13]	0/6
	2.5	0.031±0.014 ***	99	<0	0/6
	1.25	0.775±0.207 ***	71	<0	0/6
	0.625	1.489±0.215 **	43	<0	0/6
例 5	1.875	0.011±0.003 ***	100	12.3[13]	0/6
	1.25	0.010±0.004 ***	100	<0	0/6
	0.625	0.328±0.164 ***	88	<0	0/6
	0.3125	1.128±0.173 ***	57	<0	0/6
	0.15625	2.394±0.231	9	<0	0/6
例 6	2.5	0.012±0.004 ***	100	25.9[13]	3/6
	1.25	0.016±0.008 ***	99	<0	0/6
	0.625	0.272±0.066 ***	90	<0	0/6
	0.3125	1.419±0.163 **	46	<0	0/6
	0.15625	1.645±0.191 *	37	<0	0/6

<sup>a</sup> 体重の最大減少率（カッコ内は最大減少が観測された日）

<0 は体重減少が観察されなかったことを示す。

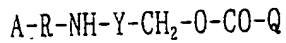
<sup>b</sup> 死亡したマウス／使用したマウス

#### 産業上の利用可能性

本発明の薬物複合体は、抗腫瘍剤や抗炎症剤などの医薬化合物を腫瘍部位などに対して部位選択的に移行し、その部位において医薬化合物を速やかに遊離することができる。また、遊離後の医薬化合物にはスペーサー部分に由来するアミノ酸が残存しないので、期待される医薬化合物の薬効を確実に発揮できるという特徴がある。

## 請求の範囲

## 1. 下記の式：



(式中、Aは薬物担体である高分子を示し；Rは1個のアミノ酸を含むスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーを示し；Yは置換基を有していてもよいフェニレン基を示し；Qは医薬化合物の残基を示す)で表される薬物複合体。

2. 薬物担体がカルボキシル基を有する多糖誘導体である請求の範囲第1項に記載の薬物複合体。

3. Rがペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーである請求の範囲第1項又は第2項に記載の薬物複合体。

4. Yが置換基を有していてもよい p-フェニレン基である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の薬物複合体。

5. Yが無置換 p-フェニレン基である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載の薬物複合体。

6. カルボキシル基を有する多糖誘導体がカルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールである請求の範囲第2項ないし第5項のいずれか1項に記載の薬物複合体。

7. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである請求の範囲第6項に記載の薬物複合体。

8. カルボキシ  $C_{1-4}$  アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求の範囲第6項又は第7項に記載の薬物複合体。

9. 医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第1項ないし第8項の

いずれか 1 項に記載の薬物複合体。

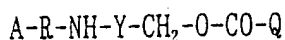
10. アミノ基を有する医薬化合物が該アミノ基を介して  $A-R-NH-Y-CH_2-O-CO-$  と結合した請求の範囲第 1 項ないし第 9 項のいずれか 1 項に記載の薬物複合体。

11. 医薬化合物が (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第 10 項に記載の薬物複合体。

12. R が  $-Gly-Gly-Phe-Gly-$  である請求の範囲第 11 項に記載の薬物複合体。

13. R が  $-Gly-Gly-Gly-Phe-$  である請求の範囲第 11 項に記載の薬物複合体。

14. 下記の式：



(式中、A は薬物担体である高分子を示し；R は 1 個のアミノ酸を含むスペーサー又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーを示し；Y は置換基を有していてもよいフェニレン基を示し；Q は医薬化合物の残基を示す) で表される D D S 化合物。

15. 医薬化合物が (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第 14 項に記載の D D S 化合物。

16. R が  $-Gly-Gly-Phe-Gly-$  である請求の範囲第 15 項に記載の D D S 化合物。

17. R が  $-Gly-Gly-Gly-Phe-$  である請求の範囲第 15 項に記載の D D S 化合物。

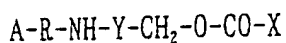
18.  $R'-NH-Y-CH_2-O-CO-Q$  (式中、R' は 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含み、N 末端が保護されているか又は保護されていない基を示し；Y は置換基を有していてもよいフェニレン基を示し；Q は医薬化合物の残基を示す) で表される化合物。

19. Y が無置換 p-フェニレン基であり、R' が  $H-Gly-Gly-Phe-Gly-$  で表される基であり、医薬化合物が (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒド

ロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオンである請求の範囲第 18 項に記載の化合物。

20. Yが無置換 p-フェニレン基であり、R'が H-Gly-Gly-Gly-Phe- で表される基であり、医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオンである請求の範囲第 18 項に記載の化合物。

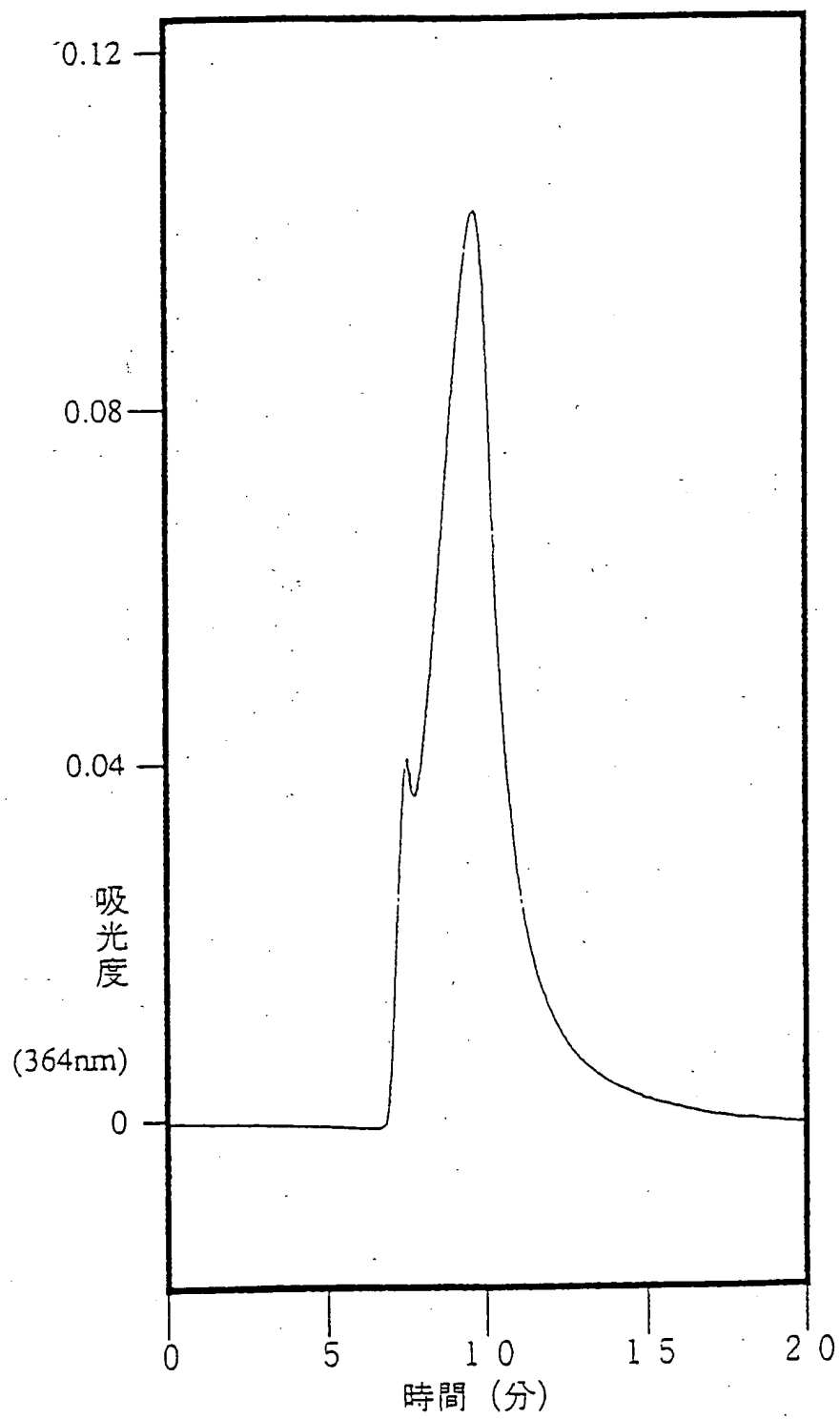
21. 下記の式：



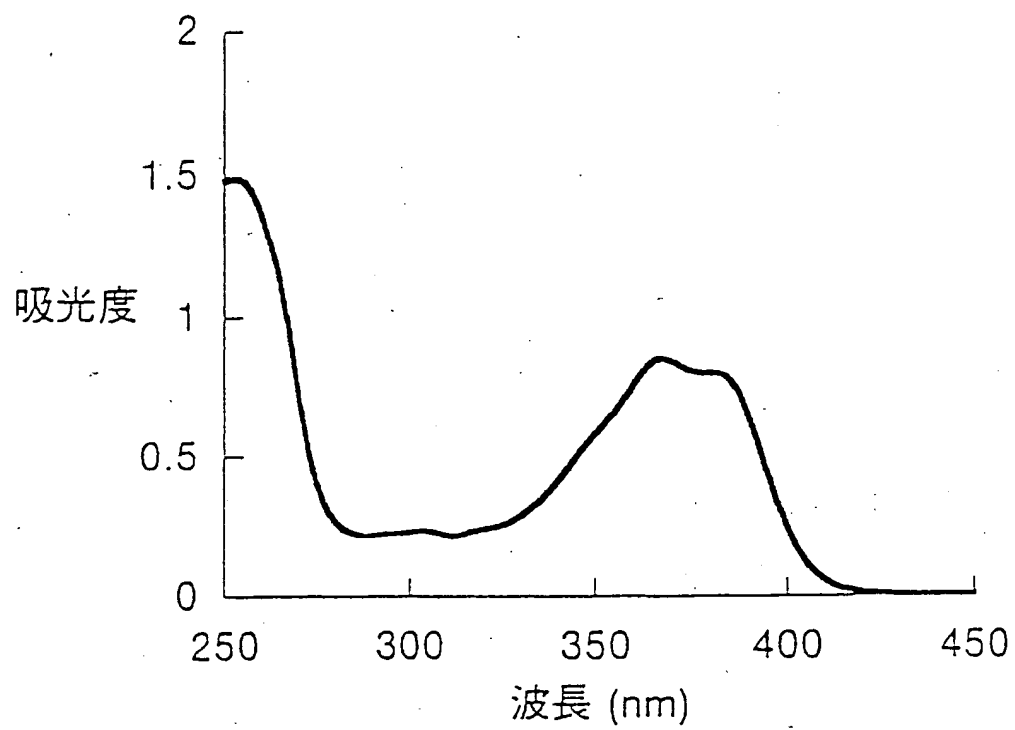
〔式中、Aは薬物担体である高分子を示し；Rは1個のアミノ酸を含むスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスペーサーを示し；Yは置換基を有していてもよいフェニレン基を示し；Xは水酸基、-O-M（Mはカルボキシル基の保護基を示す）、又は脱離基を示す〕で表される化合物。

22. 請求の範囲第1項ないし第11項のいずれか1項に記載の薬物複合体の製造に用いる請求の範囲第18項ないし第21項のいずれか1項に記載の化合物。

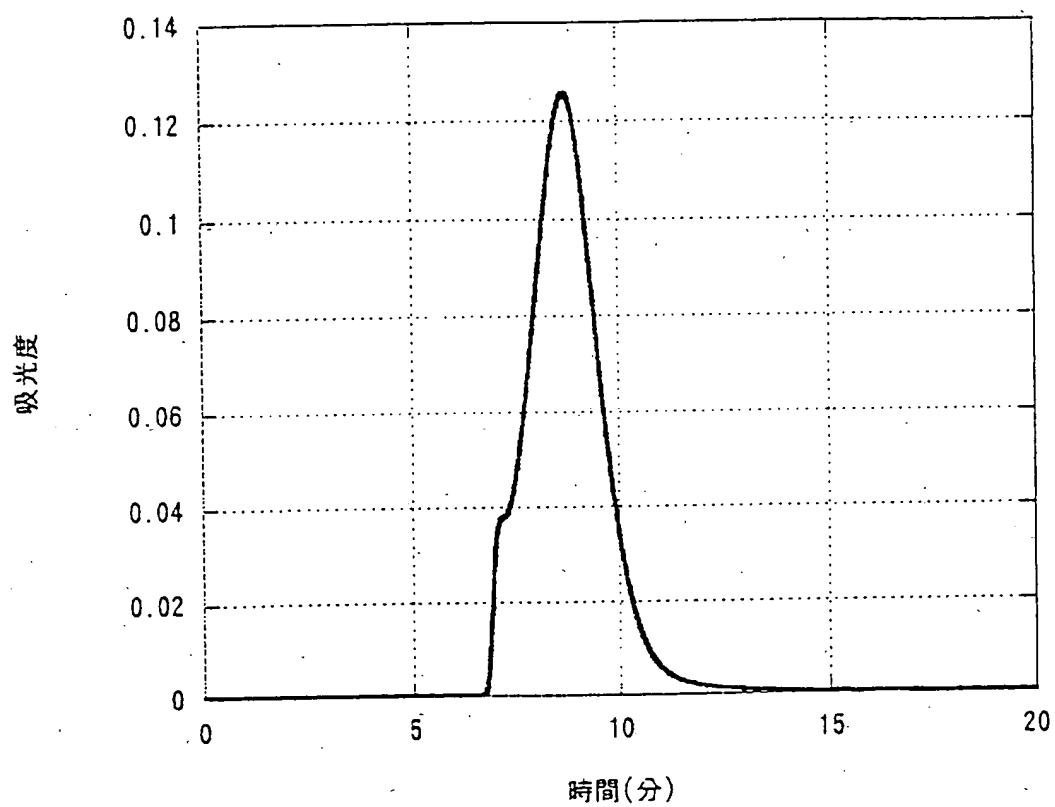
## 第1図



第2図

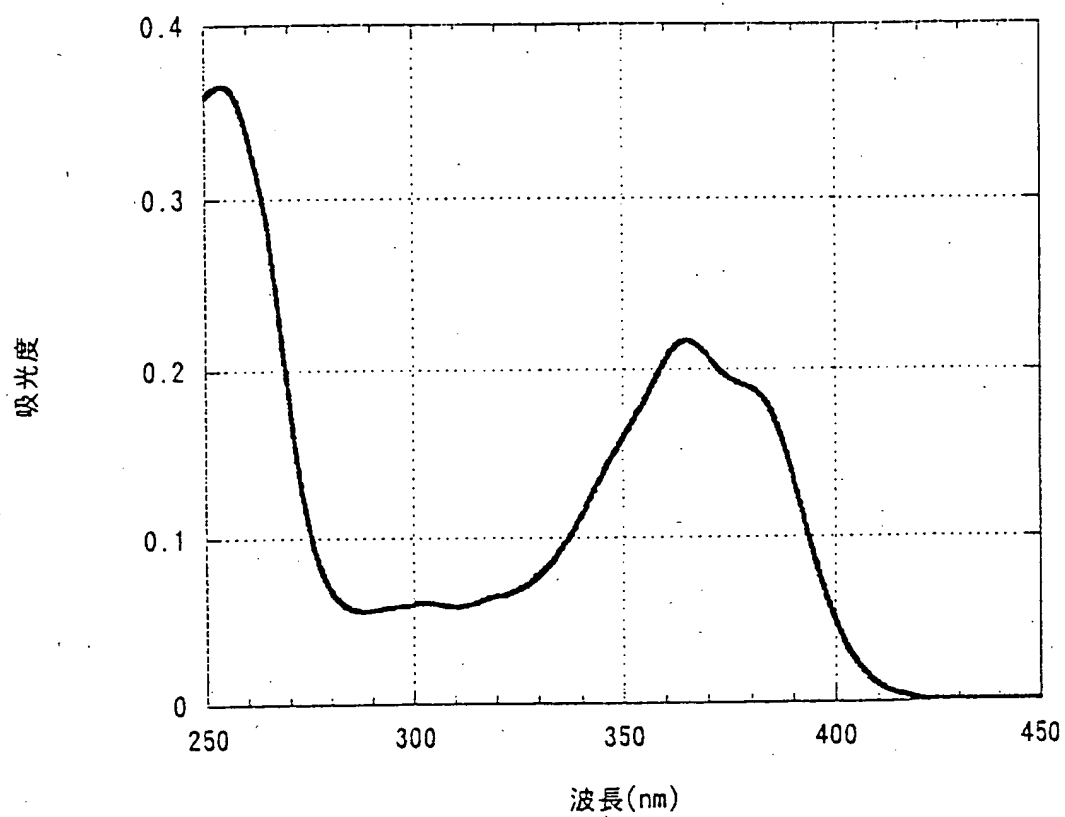


## 第3図

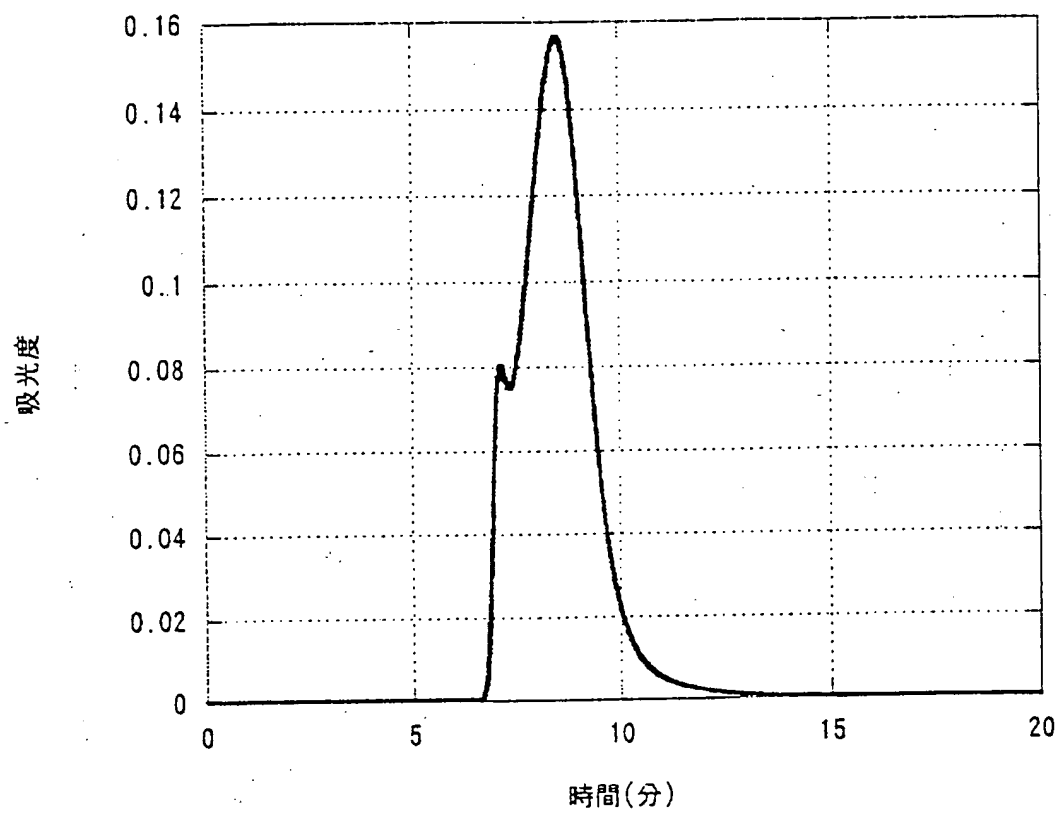




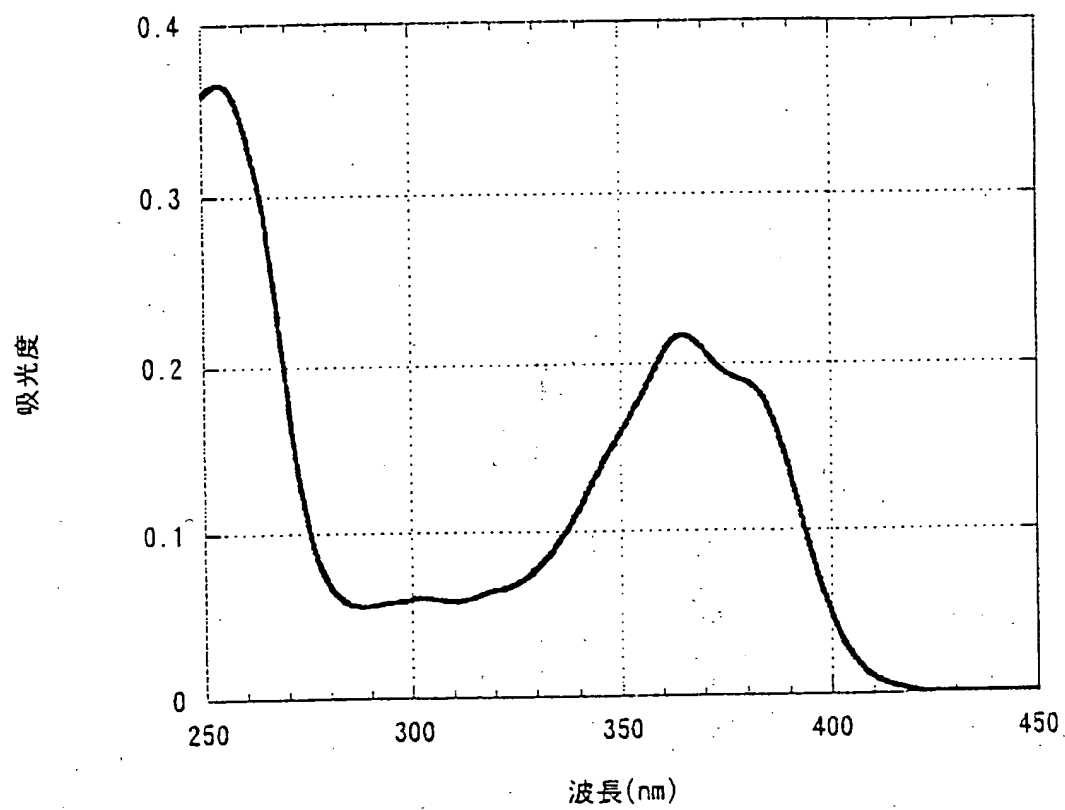
第4図



## 第5図



第6図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02681

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K47/48, A61K47/36, A61K9/00, A61K31/47, C07D491/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K47/48, A61K47/36, A61K9/00, A61K31/47, C07D491/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/46260, A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 December, 1997 (11. 12. 97), Particularly Claims & EP, 916348, A1	1-22
A	JP, 6-87746, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Yakult Honsha Co., Ltd.), 29 March, 1994 (29. 03. 94), Particularly Claims (Family: none)	1-22
A	WO, 94/19376, A1 (Drug Delivery System Institute, Ltd.), 1 September, 1994 (01. 09. 94), Particularly Claims & EP, 640622, A1 & US, 5688931, A	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\*A\* Special categories of cited documents:  
document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 July, 1999 (30. 07. 99)Date of mailing of the international search report  
17 August, 1999 (17. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02681

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K47/48, A61K47/36, A61K9/00, A61K31/47, C07D491/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K47/48, A61K47/36, A61K9/00, A61K31/47, C07D491/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/46260, A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 December, 1997 (11. 12. 97), Particularly Claims & EP, 916348, A1	1-22
A	JP, 6-87746, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Yakult Honsha Co., Ltd.), 29 March, 1994 (29. 03. 94), Particularly Claims (Family: none)	1-22
A	WO, 94/19376, A1 (Drug Delivery System Institute, Ltd.), 1 September, 1994 (01. 09. 94), Particularly Claims & EP, 640622, A1 & US, 5688931, A	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
30 July, 1999 (30. 07. 99)Date of mailing of the international search report  
17 August, 1999 (17. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/02681

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K47/48, A61K47/36, A61K9/00, A61K31/47, C07D491/22

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>8</sup> A61K47/48, A61K47/36, A61K9/00, A61K31/47, C07D491/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/46260, A1 (第一製薬株式会社), 11. 12月. 1997 (11. 12. 97), 特に特許請求の範囲 & EP, 916348, A1	1-22
A	J P, 6-87746, A (第一製薬株式会社・株式会社ヤクルト本社), 29. 3月. 1994 (29. 03. 94), 特に特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-22
A	WO, 94/19376, A1 (株式会社ディ・ディ・エス研究所), 1. 9月. 1994 (01. 09. 94), 特に特許請求の範囲 & EP, 640622, A1 & US, 5688931, A	1-22

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 07. 99

国際調査報告の発送日

17.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ

4C 9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3452